



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년05월09일  
(11) 등록번호 10-1032956  
(24) 등록일자 2011년04월27일

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0090434

(22) 출원일자 2008년09월12일

심사청구일자 2008년09월12일

(65) 공개번호 10-2010-0031369

(43) 공개일자 2010년03월22일

(56) 선행기술조사문헌

KR100796772 B1\*

연구 보고서: 한국생명공학연구 조합\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 이문메드

강원도 춘천시 후평동 198-53 생물산업벤처기업지원센터 405호

(72) 발명자

김윤원

강원 춘천시 석사동 현진에버빌 206-1301호

우수동

충북 청주시 흥덕구 분평동 보성아파트 103동 1405호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 3 항

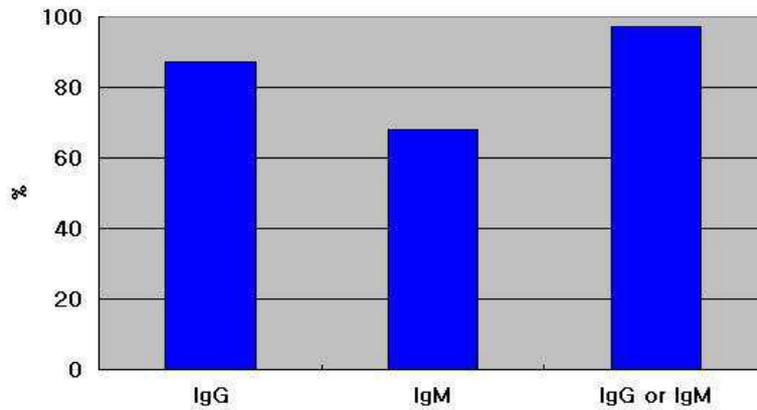
심사관 : 장정숙

(54) 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질을 이용하여 신증후출혈열 특이 I g M과 I g G를 검출하는 신속 진단 키트

**(57) 요약**

본 발명은 수청바이러스(Soochong virus)로부터 유래한 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein, NP)을 포함하는 신증후출혈열(Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)의 진단용 조성물 및 그를 이용하여 항원 특이 IgM 및 IgG를 검출하는 신속 진단 키트에 관한 것이다.

**대표도** - 도10



(72) 발명자

**백락주**

서울특별시 강남구 대치2동 미도아파트 209동 302호

**김진숙**

강원 춘천시 효자동 677-25

**조민기**

서울 강서구 등촌3동 부영아파트 105동 1301호

**장인애**

전북 익산시 영등동 부영3차아파트 308동 204호

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

진핵세포로부터 생산된 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein)을 포함하며, 신증후출혈열 특이 IgM 및 IgG를 동시에 검출하는 신증후출혈열 진단용 조성물.

**청구항 2**

- (a) 시료가 흡수되는 샘플패드(sample pad);
- (b) 시료 내의 인간의 항체와 결합하는 금 결합 패드(gold conjugation pad);
- (c) 제1항의 단백질을 항원으로 포함하는 반응선(test line)과 대조군 단백질을 포함하는 대조선(control line)이 처리되어 있는 반응막(test membrane); 및
- (d) 잔량의 시료가 흡수되는 흡수패드(absorption pad)를 포함하는 테스트 스트립으로 이루어지며, 신증후출혈열 특이 IgM 및 IgG를 동시에 검출하는 신증후출혈열 진단 키트.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제2항의 키트를 이용하여 신증후출혈열의 한탄바이러스에 대한 항체를 검출하는 방법.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 수청바이러스(Soochong virus)로부터 유래한 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein, NP)을 이용한 신증후출혈열(Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)의 진단용 조성물 및 그를 이용하여 항원 특이 IgM과 IgG를 신속하게 검출하는 신속 진단 키트에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 신증후출혈열(Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)은 한타바이러스(Hantavirus)가 원인체로 전 세계적으로 매년 20 ~ 30만 명의 환자가 발생하고, 이 중 3~7%가 사망하는 급성 열성질환으로 한국에서는 매년 천여 명의 환자가 민간인과 군인들에게서 발생하고 있는 제 2종 법정 전염병으로 분류되어 있는 질환이다.

[0003] 한타바이러스속(genus Hantavirus) 바이러스는 한탄바이러스 (Hantan virus), 서울바이러스(Seoul virus), 푸말라바이러스(Puumala virus) 및 프로스펙트힐바이러스(Prospect Hill virus)의 종이 있으며, 최근에는 수청바이러스(Soochong virus)가 분리되었다.

[0004] 한탄바이러스는 HFRS의 프로토타입(prototype) 바이러스이다. 이는 한국형 출혈열(Korean Hemorrhagic Fever; KHF) 환자의 말초혈액을 등줄쥐(*Apodemus agrarius*)에 접종하여 분리한 바이러스로 쥐(rat)에 적응된 바이러스이다. 한탄바이러스는 한국, 소련, 만주 및 유럽 등 전 세계에 분포하고 있으며, 사람에서의 병원성은 가장 강한 것으로 알려져 있다. 임상 경과를 발열기, 저혈압기, 율노기, 이노기 및 회복기의 5병기를 거쳐 감염 후 2 내지 4개월 정도 걸린다.

[0005] 서울바이러스는 집쥐(*Rattus norvegicus*)의 폐조직에서 분리되었으며, 중화능에서 한탄바이러스와 다르고, 사람에게 대한 병원성에서 한탄바이러스보다 약하여 중등도(moderate)의 신증후출혈열을 일으킨다. 도시에서 발병한

신증후출혈열 환자 중 서울바이러스에 감염된 예가 많은 것으로 되어 있고, 한국, 일본 및 동남아 지역에서 많이 보고되고 있다.

[0006] 푸말라바이러스는 스웨덴을 중심으로 한 유럽지역에 주로 분포하고 있으며, 임상증상은 경미하고 출혈성향은 거의 없으며, 신장증세가 주증상이다. 또한 전형적인 신증후 출혈열 환자에서 관찰할 수 있는 5병기를 구별하기는 어렵다.

[0007] 프로스펙트힐바이러스는 사람에게 병원성이 없는 것으로 알려져 있다. 수청바이러스는 현재 병원성을 규명하는 연구가 진행되고 있다.

[0008] 신증후출혈열은 전형적인 임상적 특성을 나타내는 경우 외에도 독감 증상과 유사한 양상을 보이거나 불현성 감염 사례로 많이 관찰되고 있으며, 국내에서 유행률이 높은 쯔쯔가무시병과 렙토스피라증 등과 같은 열성 감염성 질환과의 감별상의 문제 등으로 인해 실질적 진단은 임상적 소견 외에 혈청 검사 결과에 주로 의존하고 있는 실정이다. 신증후출혈열에 대한 혈청학적 진단법으로는 간접면역형광항체법(indirect immuno fluorescence assay, IFA)이 가장 많이 사용되고 있으나 주관적 판독에 의한 잘못된 판정이 있을 수 있으므로 결과의 판정에는 숙련된 관찰자의 판단이 요구되고 과정이 매우 번거로우며 4시간 이상의 시간이 소요된다. 그 외에도 효소면역측정법(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 혈구응집저지반응(Hemagglutination inhibition, HI), 플라크감소 중화시험(Plaque reduction neutralization test, PRNT), 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis, WB), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 등의 다양한 검사법이 사용되고 있으나, 환자의 질병 진행과정이나 치료 정도 및 예후의 판정에 중요한 신뢰도가 높은 항원 검사법은 아직 개선해야 할 문제점을 가지고 있다.

[0009] 최근 보편적으로 많이 이용되는 진단키트의 제작 방법에는 크게 효소면역검정법(Enzyme Immunoassay, EIA), 응집법(Agglutination Assay), 딥-스틱(Dip-stick), Lateral flow assay 등 4가지 방법이 있다. EIA의 경우, 높은 민감도를 가지는 장점이 있으나 특이도가 낮고 진단 전에 많은 전처리 공정을 거쳐야하므로 많은 시간이 소요되고 특수 판독장비가 필요하다는 단점을 가지고 있다. 평판응집법은 역시 전처리 공정이 필요하지만, 판독에 소요되는 시간이 매우 짧은 반면에 민감성이 낮고 결과의 판독이 용이하지 않은 단점이 있으며, 튜브응집법은 과정이 번거롭고 판독에서 애매한 경우가 빈번하며 시간이 2시간 이상 소요되는 단점을 가지고 있다. 딥-스틱(Dip-stick)은 여러 가지 병원체에 대해 적용이 가능하고 저가인 장점이 있으나, 역시 전처리 공정이 필요하고 판독까지 약 3시간이 소요되는 단점을 가진다. 단시간 내에 진단가능하기 때문에 신속진단키트(rapid diagnostic kit)라고도 하는 Lateral flow assay 방법은 가장 최근에 개발된 방법으로써 전처리가 필요하지 않고, 15분 이내에 육안으로 판독이 가능하며 또한 저가인 장점을 가지나, 그 적용을 위해서는 특정 병원체에 대한 특정 항원을 확보해야하는 단점을 가지고 있다.

[0010] 이에, 본 발명자는 한타바이러스의 일종인 수청바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질을 이용하여 항원특이 IgM과 IgG를 검출할 경우 신증후출혈열에 대한 민감도와 특이성이 향상될 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 신증후출혈열 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 뉴클레오캡시드 단백질을 이용하여 신증후출혈열을 진단하기 위한 키트 및 그를 이용하여 신증후출혈열에 대한 항체를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

**과제 해결수단**

- [0013] 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질을 포함하는 신증후출혈열 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에서 용어, “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 신증후출혈열을 확인하는 것이다.
- [0015] 본 발명에서 용어, “신증후출혈열”이란 한타바이러스와 서울바이러스에 의하여 유발되는 질환을 의미한다. 본 발명에서는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질(CNP) 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지는 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 단편(TNP)으로 신증후출혈열에 감염되었는지 여부를 진단할 수 있다.
- [0016] 수청바이러스는 한타바이러스에 속하는 바이러스로서, 최근에는 발견되었다. 한타바이러스는 3개의 음성가닥 RNA(negative-stranded RNA)를 게놈으로 갖고 있으며, 그 크기에 따라 L(large), M(middle), S(small)로 구분할 수 있다. L 분절은 바이러스 고유의 RNA-의존 RNA 중합효소(RNA dependent RNA polymerase)에 대한 유전자를 갖고 있으며, M 분절은 65 내지 74 및 55 내지 60kDa 크기의 막단백질인 당단백질 1(glycoprotein 1, G1)과 당단백질 2(glycoprotein 2, G2)에 대한 유전자를 가지고 있고, S 분절은 각 분절들을 감싸는 50 내지 53kDa 크기의 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein, NP)에 대한 유전자를 갖고 있다.
- [0017] 본 발명자는 상기 수청바이러스의 S 분절(서열번호 1)로부터 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 뉴클레오캡시드 단백질(CNP) 및 이의 단편인 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 뉴클레오캡시드의 단백질 단편(TNP)을 획득하고(도 1), 이들이 신증후출혈열 환자 혈청과 반응을 하지만, 일반 혈청과는 반응을 하지 않음을 확인하여 신증후출혈열 진단을 위한 항원으로 유용하게 사용할 수 있음을 밝혔다.
- [0018] 상기 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 단백질은 화학적으로 합성할 수도 있고 유전자 재조합 방법을 이용하여 미생물 또는 진핵세포에서 제조될 수도 있으나, 그의 제조방법이 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다. 상기 유전자 재조합 방법을 이용하기 위한 벡터로는 인간 및 동물에는 감염성이 없으면서 재조합 단백질을 발현시킬 수 있는 전이벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 구체적 실시에서, 바콜로바이러스 전이 벡터를 사용하였다.
- [0019] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질을 항원으로 포함하는 테스트 스트립이 포함된 신증후출혈열 진단 키트에 관한 것이다.
- [0020] 구체적으로, 본 발명은
- [0021] (a) 시료가 흡수되는 샘플패드(sample pad);
- [0022] (b) 시료 내의 인간의 항체와 결합하는 금 결합 패드(gold conjugation pad);
- [0023] (c) 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질을 항원으로 포함하는 반응선(test line)과 대조군 단백질을 포함하는 대조선(control line)이 처리되어 있는 반응막(test membrane); 및
- [0024] (d) 잔량의 시료가 흡수되는 흡수패드(absorption pad)
- [0025] 를 포함하는 테스트 스트립으로 이루어지는 생물학적 시료 내의 신증후출혈열 항체(IgM 및 IgG)를 검출하는 신증후출혈열 진단 키트에 관한 것이다.

- [0026] 도 8에서 보는 바와 같이, 본 발명의 바람직한 신증후출혈열 진단 키트는 샘플패드, 금 결합 패드, 반응막 및 흡수패드를 포함하는 테스트 스트립을 포함하고 있다. 샘플패드는 금 결합 패드 위에 겹쳐져 있어 제1 중첩 부분을 형성하고, 금 결합 패드는 반응막 위에 겹쳐져 있어 제2 중첩 부분을 형성한다. 또한 반응막과 흡수패드는 제3 중첩 부분을 형성한다. 생물학적 시료가 샘플패드 상에 점적되면 모세관 현상에 의하여 생물학적 시료는 금 결합 패드, 예를 들어 골드-라벨된 프로틴 A(gold-labeled protein A) 또는 골드-라벨된 염소 항 인간 IgM 항체(gold-labeled goat anti-human IgM antibody) 등을 포함하고 있는 금 결합 패드를 통과하게 된다. 골드-라벨을 형성하는 금 입자는 바람직하게 20 내지 55nm의 지름 크기, 보다 바람직하게는 20 내지 40nm의 지름 크기를 가지며, 염색 지시자(indicator dye)로서 작용한다. 상기 금 결합 패드를 통과함에 따라, 생물학적 시료 내의 항체는 골드-라벨된 프로틴 A 등과 결합하여 복합체를 형성하고, 상기 복합체는 반응막을 따라 이동한다.
- [0027] 본 발명에서 사용된, 용어 “생물학적 시료” 또는 “시료”는 신증후출혈열이 의심되는 인간을 포함하는 포유동물의 혈청, 혈장, 혈액 등을 말한다. 생물학적 시료는 본 발명의 진단 키트의 샘플 패드에 점적하기 전에 희석하여 사용하거나 또는 희석하지 않고 사용할 수 있다. 생물학적 시료에 한탄바이러스 또는 서울바이러스에 대한 항체가 있는 경우에는 본 발명의 상기 진단키트 내 수청바이러스로부터 유래된 뉴클레오캡시드 단백질 항원과 결합하여 육안으로 식별할 수 있도록 반응막 위의 반응선에서 색 변화가 일어난다. 그러나 생물학적 시료에 한탄바이러스 또는 서울바이러스에 대한 항체가 없는 경우에는 본 발명의 상기 항원과 결합하지 않아 반응막 위의 반응선에서 아무런 변화가 일어나지 않는다. 즉, 본 발명의 바람직한 실시예에서는, 한탄바이러스 항체는 반응막 위의 반응선에 고정되어 있는 수청바이러스로부터 유래된 뉴클레오캡시드 단백질 항원에 결합한다. 이 항원-항체 복합체의 형성으로 상기 골드 복합체에 의한 염색 지시자(indicator dye)가 침전하면서 검출할 수 있는 붉은 보라색 밴드를 나타내고, 이에 따라 생물학적 시료 내에 한탄바이러스 또는 서울바이러스에 대한 항체가 존재하는 양성 반응을 나타내게 된다.
- [0028]
- [0029] 반응막은 규격화된 크기(10X500nm)의 니트로셀룰로오스막(Milipore™ XA3J072100) 등의 적합한 물질을 포함할 수 있다. 반응막은 상기 반응선 및 대조선이 순서대로 배열되는 것이 바람직하며, 이들 반응선 및 대조선은 2.0 내지 4.5mm의 간격, 바람직하게는 2.5 내지 3.0mm로 배열될 수 있다.
- [0030] 신증후출혈열에 대한 양성 반응 결과는 대조선 외에 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 항원 단백질을 포함하고 있는 반응선이 발색하는 경우이다. 상기 대조선은 진단 키트의 이상 유무를 확인하기 위한 것이다. 신증후출혈열에 대한 음성 반응 결과는 대조선만이 발색하는 경우이다. 상기 대조선은 골드-라벨과 결합하는 대조군 단백질을 포함하고 있는데, 이는 예를 들어 토끼 항-염소 IgG 다클론 항체, 염소 항-인간 IgG 다클론 항체, 토끼 항-인간 IgM 다클론 항체 또는 염소 항-인간 IgM 다클론 항체 등을 포함할 수 있으며, 이들 대조군 단백질을 0.1mg/ml 내지 1.0mg/ml의 농도로 포함할 수 있다. 상기 반응선은 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 수청 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 항원 단백질을 포함하고 있으며, 이들 항원 단백질은 0.5 내지 1.0mg/ml의 농도로 반응선에 포함된다.
- [0031] 금 결합 패드는 적합한 마커, 예를 들어 마커로서 건조된 콜로이드성 골드-라벨된 프로틴 A(gold labeled portein A), 골드-라벨된 항-인간 IgG 항체(glod-labeled anti-human IgG antibody) 또는 골드-라벨된 항-인간 IgM 항체(gold-labeled anti-human IgM antibody) 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게 샘플패드에 인접하여 위치할 수 있다. 상기 골드 라벨된 마커가 금 결합 패드에 과량으로 포함될 경우에는 분석하고자 하는 한탄바이러스에 대한 항체가 비교적 낮은 영역에서도 비특정신호로 증가됨으로써 위양성 결과를 초래할 수 있으므로, 본 발명에서는 골드-콜로이드 원액을 희석하여 흡광도(optical density; OD)가 1 내지 6, 바람직하게는 흡광도가 2 내지 4의 농도로 포함할 수 있다. 흡수패드는 막의 반대편 말단에 위치하며 모세관 현상에 의해 막을 따라 이동한 생물학적 시료, 예를 들면 혈청, 혈장 등을 흡수한다.
- [0032] 하나의 구체적 실시예에서, 진단 시간은 약 5 내지 10분으로서, 15분 이내이다. 진단 결과는 환자의 한타바이러스

스속 감염 상태를 진단하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 만일 신증후출혈열 환자로부터 수집된 생물학적 시료라면, 본 발명의 진단 키트는 양성 반응을 나타내어 신증후출혈열을 진단할 수 있으며, 만일 신증후출혈열이 없는 환자로부터 수집된 생물학적 시료인 경우 본 발명의 진단 키트는 음성 반응을 나타내어 신증후출혈열이 아닌 것으로 진단할 수 있다.

[0033] 상기한 서열번호 2 또는 3의 아미노산 서열을 가지는 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 항원 단백질을 포함하고 있는 진단 키트의 신증후출혈열에 대한 민감도와 특이도를 간접면역형광항체법(IFA)와 비교하여 조사한 결과, 본 발명의 진단 키트는 96% 이상의 민감도와 특이도를 나타냈으며, IgM을 검출하는 초기 진단에서도 간접면역형광항체법에 비하여 두 배 이상의 높은 민감도를 나타내었다. 따라서, 본 발명의 진단 키트는 신증후출혈열을 효과적으로 진단할 수 있으며, 특히 초기 감염 여부도 종래의 방법에 비하여 효과적으로 진단할 수 있다.

[0034] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 신증후출혈열이 의심되는 환자로부터 생물학적 시료를 채취하는 단계 및 상기 신증후출혈열 진단 키트를 이용하여 상기 생물학적 시료로부터 항체를 검출하는 단계로 구성되는 신증후출혈열에 대한 항체 검출 방법에 관한 것이다.

[0035] 구체적으로, 신증후출혈열이 의심되는 환자로부터 생물학적 시료, 예를 들어 혈청을 채취하고, 이 채취된 생물학적 시료를 상기 진단 키트의 시료가 흡수되는 부위인 샘플패드(sample pad)에 점적하면, 생물학적 시료는 모세관 현상에 의해 금 결합 패드(gold conjugation pad)에 도달하여 시료 내의 항체가 금 결합 패드 내의 마커, 예를 들어 골드-라벨된 프로틴 A(gold-labeled protein A), 골드-라벨된 항인간 IgG 항체(gold-labeled anti-human IgG antibody) 및 골드-라벨된 항인간 IgM 항체(gold-labeled anti-human IgM antibody) 등에 결합하여 콜로이드를 형성하게 된다. 이때, 검체하고자 하는 생물학적 시료는 상기 금 결합 패드에 고정화되지 않고 계속 이동하여 수청바이러스 유래 뉴클레오캡시드 항원 단백질이 고정화되어 있는 반응선(test line)에 도달하게 된다. 신증후출혈열 환자의 생물학적 시료인 경우에는 상기 항원과 항원-항체 반응을 일으키게 되는데, 즉 환자의 금 결합 패드 내의 특정 마커에 결합된 항체는 반응선에 고정된 수청바이러스주 유래 뉴클레오캡시드 항원 단백질에 결합하여 붉은 보라색 밴드를 형성함으로써 육안으로 관찰할 수 있게 된다. 그리고, 생물학적 시료 내 항체와 반응하지 않은 나머지 금 결합 패드 내의 마커는 대조선에 도달하여 대조군 단백질과 반응하여 붉은 보라색 밴드를 형성함으로써 검사의 적합성을 나타내게 된다. 이와 같은 방법에 의하여 신증후출혈열에 대한 항체를 검출할 수 있게 된다.

**효과**

[0036] 상기한 바와 같이, 본 발명의 신증후출혈열 진단용 조성물 및 그를 이용한 진단 키트는 종래의 진단 방법에 비하여 향상된 민감도 및 특이도를 제공하고, 간편하고 신속하게 신증후출혈열을 진단할 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0037] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이는 본 발명의 이해를 돕기 위해 추가된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

**[0038] 실시예 1: 수청바이러스 및 배양세포**

[0039] 국내 흰넓적다리붉은쥐(*Apodemus peninsulae*)에서 분리된 수청바이러스주(Soochong virus strain) SooV-2을 베로세포(Vero cell)에서 계대 배양하였다. 베로세포(Vero cell)의 증식과 유지에는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 함유된 EMEM(Eagle's minimal essential medium)으로 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였으며, 90% 정도 단층 배양되었을 때 사용하였다.

[0040] **실시예 2: 바이러스 RNA의 분리**

[0041] 수첨 바이러스가 증식된 세포를 1,075g (3000rpm)으로 3분간 원심분리 한 후, Trizol LS(Gibco) 용액 750ul을 넣어 실온에서 5분간 방치한 후, 클로로포름을 200ul 첨가하고 잘 섞어준 후, 다시 실온에서 10분간 방치하였다. 4℃에서 17,000g (12,000rpm)으로 15분간 원심분리하여 침전물을 제거하고, 상층액에 동일 부피의 이소프로필 알코올을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후, 다시 4℃에서 17,000g (12,000rpm)으로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시키고, 75% 에탄올로 한번 씻어 주었다. RNA 침전물을 공기 중에서 10분간 건조시킨 후 DEPC가 처리된 물에 녹였다.

[0042] **실시예 3: cDNA 합성과 연쇄효소중합반응**

[0043] 도 1에 있는 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein, NP)을 코딩하는 서열번호 1의 핵산서열(GenBank accession No. AY675350)로부터 cDNA를 합성하기 위해 실시예 2에서 분리한 RNA 용액 4 ul에 표 1의 각 프라이머 (10 pmole)를 1 ul씩, 5X reverse transcriptase buffer), 10mM dNTPs, 100pmole/ul Oligo(dT), 40units/ul RNasin, 200units/ul MMLV reverse transcriptase 혼합물을 넣어주었다. 30℃에서 10분간 반응을 시킨 후, 45℃에서 30분, 99℃에서 5분, 5℃에서 5분간 반응을 시켜 cDNA를 합성하였다.

[0044] PCR은 cDNA 산물 5ul, 10pmole primer 한쌍, 10mM dNTPs, 10X taq buffer, 5units/ul Taq polymerase를 잘 섞은 후 95℃ 5분, 52℃ 2분, 72℃ 2분을 주기로 1회 반응, 95℃ 1분, 52℃ 1분, 72℃ 1분을 주기로 5회 반응을 시켰다. 95℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1분을 주기로 20회 반응을 시켰으며, 95℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 7분을 주기로 1회 반응시켜 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA는 -20℃에서 보관하였다.

[0045] 도 2에서 보는 것과 같이 각 프라이머로 PCR 수행하여 파편단백(Truncated NP: TNP)의 DNA를 약 370bp에서 확인하였고, 전체단백(Complete NP: CNP)의 DNA도 약 1,300bp에서 band로 확인하였다.

[0046]

**표 1**

[0047] 수첨 바이러스(Soochong Virus) 재조합 항원 생산을 위한 PCR 프라이머

Primer	전체 단백 (CNP)	파편 단백 (TNP)
Forward primer	5' <u>AGA TCTA</u> ATG GCA ACT ATG GAG GAA TTG 3' (서열번호 4) <Bgl II (AGATCT) ; AGATCT 첨가>	5' <u>AGA TCTA</u> ATG GCA ACT ATG GAG GAA TTG 3' (서열번호 6) <Bgl II ; AGATCT 첨가>
Reverse primer	5' <u>AAGC TTA</u> TAG TTT TAA AGG TTC TTG GTT TG 3' (서열번호 5) <Hind III(AAGCTT) ; AAGC 첨가>	5' <u>A AGC TTA</u> CCA GTC TGC AGT CTG ACC TGT 3' (서열번호 7) <Hind III ; AAGCTTA 첨가>

[0048] **실시예 4: 증폭 산물의 클로닝**

[0049] 연쇄효소중합반응에 의해 증폭된 약 370 bp와 약 1,300 bp의 DNA를 아가로즈겔에서 전기용출(electroelution)하여 클로닝 벡터인 pGem-T-Easy PCR 클로닝 벡터(Invitrogen)에 클로닝하였다(도 3). 제한효소 Bgl II와 Hind III로 절단하여 TNP와 CNP의 DNA를 확인하였다. 이는 CNP(1287bp:37-1323)와 TNP(357bp:37-393) 폴리펩티드 생산을 위한 것이고, 이의 아미노산서열은 서열번호 2와 3에 나타내었다. TNP를 포함하는 369bp가 삽입된 플라스미드를 pGT-SooV2-TNP로, CNP를 포함하는 1299bp가 삽입된 plasmid를 pGT-SooV2-CNP로 명명하였다(도 3).

[0050] **실시예 5: 발현벡터에 클로닝**

[0051] N-말단에 His-Taq이 포함된 발현 융합 벡터(expression fusion vector)인 pBlue-Bac-His2B (Invitrogen)를 제한효소 Bgl II와 Hind III로 처리하였으며, pGT-SooV2-TNP와 pGT-SooV2-CNP의 PCR 산물(product)도 제한효소 Bgl II와 Hind III로 처리하여 클로닝시켜 pBac-SooV2-TNP와 pBac-SooV2-CNP를 얻었다(도 4).

**[0052] 실시예 6: 재조합 바큇로바이러스(baculovirus)의 제작**

[0053] pBac-SooV2-TNP와 pBac-SooV2-CNP는 Bac-N-Blue 바큇로바이러스 발현벡터 시스템(baculovirus expression vector system)을 이용하여 Bac-SooV2-TNP와 Bac-SooV2-CNP로 제작하였다(도 5).

[0054] Log phase에 있는 Sf9 세포( $2 \times 10^6$ 개)를 60mm 디쉬에 부어 단층(monolayer)이 되게 하였다. 트랜스펙션 혼합물(transfection mixture)을 준비하기 위해, 10ul (0.5ug)의 Bac-N-Blue™ DNA를 마이크로원심분리기(microcentrifuge)에 넣고 아래의 용액을 넣었다.

[0055] pBac-SooV2-TNP 또는 pBac-SooV2-CNP (1ug/ul) : 4ul

[0056] Grace's insect media (without supplements or FBS) : 1 ml

[0057] Cellfectin reagent (mix well before use and always ) : 20 ul

[0058]

[0059] 실온에서 15분간 방치 하면서, 디쉬의 배지를 제거하고 supplement나 FBS가 함유되지 않은 Grace's insect media 2 ml을 첨가하였다가, 다시 모노레이어(monolayer)로부터 배지를 제거한 후, 준비된 트랜스펙션 혼합물을 60mm 디쉬에 방울방울 넣는다. 이 디쉬를 실온에서 4시간정도 방치한 후, TNM-FH medium 1 ml을 첨가하고 디쉬를 봉인하여 27°C에서 72시간 인큐베이션하였다. 이렇게 동시트랜스펙션(cotransfection)되어 복제된 재조합 바큇로바이러스를 바이러스 스톡(virus stock)으로 한다.

**[0060] 실시예 8: 재조합 바큇로바이러스 정제**

[0061] 종말점 희석법(End-point dilution method)에 의해 virus stock의 농도를 측정하였다.

[0062] 바이러스의 농도(titer)를 결정하기 위한 종말점(end-point) 희석은 바이러스 접종액을  $10^{-5}$  내지  $10^{-8}$ 배까지 단계 희석하고, 96웰 플레이트에 각 웰 당 세포  $1 \times 10^4$ 개의 농도로 분주된 배양세포에 각 희석액을 접종하고 27°C에서 계속 배양하였다. 바이러스 농도는 바이러스가 감염된 웰과 감염되지 않은 웰의 비율로부터 계산하여 PFU(plaque Forming Unit)를 결정하였다.

[0063] 순수한 바이러스의 선발을 위해서는 바이러스 접종액을  $10^{-2}$  내지  $10^{-8}$ 배까지 희석하고, 96웰 플레이트에 웰 당 세포  $1 \times 10^4$ 개의 농도로 분주된 배양세포에 각 희석액을 접종하고 27°C에서 계속 배양하였다. 접종 4일 후부터 세포내 다각체 형성 및 바이러스 감염유무를 현미경으로 관찰하여 최대 희석배수의 웰에 있는 바이러스를 선발하고, 동일한 방법으로 3회 이상의 순화과정을 거쳐 순수한 바이러스를 선발하였다.

**[0064] 실시예 9: 재조합 단백질의 발현 및 분리**

[0065] 곤충세포 Sf9 cell을 75cm<sup>2</sup> 플라스크에 약  $5 \times 10^6$  정도를 과종(seeding) 한 후, 5 MOI의 재조합 바이러스를 접종하였다. 감염 후 5일에 봉입체(inclusion body) 형성을 확인한 후 세포를 모두 수거하였다. 수거한 세포는 6,000g (7,000 rpm)으로 원심분리하여 침사를 모으고 1 X binding buffer (5 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.5 M NaCl)로 부유한 후, 초음파분쇄기로 18 Hz에서 15초간 6회 교반하였다. 23,400g (14,000rpm)에서 15분간 원심분리하여 상층액을 용해분획(soluble form)으로 보관하였다. 또한 침사인 비용해분획(insoluble form)을 6M Urea가 포함된 1 X binding buffer로 부유한 후 4°C에서 1시간동안 방치를 시켰다가 23,400g (14,000rpm)에서 30분간 원심분리를 하여 상층액(lysed pellet)을 수거하였다. 수거된 상층액(lysed pellet)을 His-bind 크로마토그래피를 통해 정제하였다(purified pellet). 용해분획(soluble form), 상층액(lysed pellet), 그리고 정제된 분획(purified pellet)을 SDS-PAGE를 시행하여 어느 분획에 재조합 단백질이 존재하는지를 웨스턴 블롯을 실시하여 확인하였다. 대조로는 야생형 바이러스 감염세포의 용해분획(soluble form)을 사용하였다. 웨스턴 블롯을 수행하는데 1차 항체로는 신증후출혈열(HFRS) 환자 및 정상인 혈청을 사용하였다.

[0066] 도 6에서 보는 바와 같이, TNP의 경우 세포 침사(insoluble form)에서 보다는 용해(soluble) 형태로 더 많은 단백질이 존재함을 확인하였다. TNP 분획인 22kDa의 특정 밴드(specific band) 외에 그 밑에 약하게 보이는 밴드에 대해서는 용해 분획(soluble form)뿐만 아니라 정제된 분획(purified pellet)에서도 환자혈청에 의한 웨스턴 블롯 결과 강하게 나타남으로써 특이반응에 의한 결과인 것으로 추정되었다. 또한 정상인에 대해서는 두 밴드 모두 나타나지 않음으로써 이를 입증하였다. 아래 밴드는 TNP의 부분 분해(degradation)에 의한 것으로 추정되었다.

[0067] 도 7은 CNP와 TNP의 정제된 분획(purified pellet)을 웨스턴 블롯 실시한 것이다. 결과에서 보는 것처럼 CNP는 신증후출혈열(HFRS) 환자에만 반응하고 약 50kDa의 재조합 단백질을 생성함을 확인하였다.

[0068] **실시예 10: His-bind 친화 크로마토그래피로 재조합 단백질의 정제**

[0069] His-bind resin (Novagen)을 column에 2 ml이 되도록 채운 후, 증류수와 1 X charge buffer, 1 X binding buffer를 사용해 column을 준비하였다. 항원단백을 column에 통과시킨 후 1 X binding buffer (5 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.5 M NaCl)와 1 X washing buffer (40 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.5 M NaCl)로 세척하였다. Elution buffer (300 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9)를 통과시켜 단백질을 1 ml씩 회수하였다. 각각 분획내의 단백질 농도는 플리법을 이용하여 정량하였으며 SDS-PAGE와 Western blot을 하여 단백질을 확인하였다.

[0070] **실시예 11: 재조합 단백질 분석**

[0071] **11-1. Western-blot**

[0072] 1 mm 또는 1.5 mm 두께의 10% gel에 정제한 재조합 단백을 웰당 10 ug씩 전기영동을 실행하였다. 전기영동한 겔을 Bio-rad transport 기계를 이용해 80 volt에서 40분간 트랜스퍼(transfer)하였다. 트랜스퍼(transfer)된 막(membrane)을 5% skim milk-TBST (Tris-buffered Saline Tween 20)로 1시간 동안 블로킹하였으며, 1차 항체인 환자 혈청은 1:3000으로 희석해 1시간동안 반응을 시켰다. 2차 항체는 Horse-radish peroxidase conjugate anti-human IgG를 1:10000으로 희석해 반응시켰다. 반응이 끝난 후 ECL kit를 사용해 발색시켰다.

[0073] 웨스턴 블롯 결과, 재조합 CNP와 TNP는 신증후출혈열 환자 혈청에서는 CNP의 경우 50kDa, TNP는 22kDa 정도에서 반응을 하지만 일반 정상인 혈청과는 반응하지 않는 것으로 나타났다(도 6, 7).

[0074] **11-2. Dot-blot**

[0075] 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 1 ug의 재조합 단백질을 점적하여 37°C에서 1시간 동안 건조시켰다. 건조된 막은 5% skim milk-TBST로 1시간 동안 블로킹하였으며, 1차 항체인 환자 혈청과 정상인 혈청을 1:3,000으로 희석해 1시간 동안 반응을 시켰다. 2차 항체인 Horse-radish peroxidase conjugate anti-human IgG를 1:10,000으로 희석해 반응시켰다. 반응이 끝난 후 ECL kit를 사용해 발색시켰다.

[0076] 한탄바이러스 또는 서울바이러스에 감염된 신증후출혈열 환자 혈청을 가지고 Dot-blotting을 실시한 결과, 표 2에서 보는 것과 같이 CNP가 TNP보다는 양성 시그널(positive signal)이 강하게 나타나고 있으며, 일반 정상인 혈청과는 모두 반응을 하지 않는 것으로 나타났다.

**표 2**

[0077] Reactivities of recombinant NP antigens against HRFS patients by Dot-blot.

HRFS patients serum No.	IFA value (HTN)	<sup>a</sup> Dot-blot Value	
	IgG	TNP (IgG)	CNP (IgG)
2001-216	1280	+++	+++
2001-193	80	+	+
2001-36	160	++	+++
2001-42	1280	+++	+++
2000-449	1280	+++	+++
99-445	640	+++	+++
99-485	320	+	++
99-444	640	+++	+++
99-235	320	+	++

[0078] <sup>a</sup> Data are presented as a strong positive(+++), middle positive(++) or scarcely positive(+) result by Dot-blot.

[0079] \* Ten normal sera did not react with recombinant NP antigens

[0080] **11-3. ELISA**

[0081] 재조합 단백항원을 1ug/ml이 되도록 0.05M 탄산염완충용액(pH 9.6)에 희석하여 96웰 마이크로플레이트에 코팅한 후 4℃에서 18시간 동안 반응시켰다. 0.05% Tween 20이 포함된 인산완충용액(PBST)로 2회 세척한 후 3% BSA로 37℃에서 2시간동안 블로킹을 하였다. 1차 항체를 한탄(Hantaan), 서울(Seoul), 푸말라(Pummala) 또는 프로스펙트힐(Prospect Hill) 바이러스가 감염된 랫의 혈청을 희석하여 사용하였고, 2차 항체는 Horse-radish conjugate anti-rat IgG (IgM)를 1:6000으로 희석해 사용하였다. 발색기질용액으로 발색시킨 후 ELISA 관독기로 파장 490nm에서 OD를 측정하였다.

[0082] 표 3에서 보는 것과 같이 재조합 항원 CNP는 한탄바이러스와 서울 바이러스에는 반응을 하지만, 푸말라바이러스와 프로스펙트힐바이러스와는 반응하지 않는 것으로 나타났다.

**표 3**

[0083] Antigenic Characteristics of Recombinant CNP to Rat Antisera infected with Hantavirus

Rat Antisera against	Hantaan	Seoul	Pummala	Prospect Hill
Reactivity of CNP by ELISA	+++	+++	-	-

[0084] 이제까지 CNP와 TNP의 항원성 결과를 테스트해 본 결과, TNP보다는 CNP가 항원성이 좀더 우수하다는 것을 알 수 있었다. 우리는 항원성이 우수한 CNP를 가지고 신증후출혈열을 진단할 수 있는 진단키트에서의 성능을 확인하기 위해 진단키트를 제작하였다.

[0085] **실시예 12: 면역크로마토그래피(Immunochromatography)를 이용한 lateral flow assay (신속진단키트: Rapid Diagnostic Kit, RDK)**

[0086] **12-1. 니트로셀룰로오스 막상에 항원 고정화**

[0087] 분석 특이항체를 포획하는 역할을 하는 특이 항원의 고정화는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose (NC)

membrane) (5um 세공크기)상에서 정전기 상호작용(electrostatic interaction)에 의해 수행된다. 동결건조된 재조합 항원을 0.1% SDS buffer에 녹인 후 플라스틱 백킹(plastic backing)된 NC 막 스트립 (5X25mm)의 하단으로부터 1 cm 떨어진 부분에, 대조군 항체 (anti-Goat-IgG)는 1.4cm 위치에 디스펜서(dispenser)를 사용하여 1 ul/cm의 속도로 점적하였다. 점적된 막은 37°C에서 1시간동안 건조시켰다.

[0088] 동결건조된 항원을 용해하는 SDS buffer의 농도와 항원의 농도를 달리하여 수행한 결과, 발색된 신호는 항원농도 0.6mg/ml에서 최대로 나타났으며, 그 이하나 이상의 농도에서는 감소하는 것으로 나타났다. 이는 신호발색이 크기 위해서는 분석항체와 결합할 충분한 양의 항원이 필요하나 과량의 항원이 일정지역에 밀집된 경우에는 항원-항체 반응을 위한 공간적 접근이 어려워져서 면역부착반응 확률이 낮아지기 때문으로 판단된다.

[0089] **12-2. 항원 점적용 버퍼**

[0090] ① Tween 20

[0091] Tween 20의 경우, 항원 단백질의 비특이적 반응에 영향을 주고 있으며 농도가 높을수록 시그널의 강도가 감소되며 교차반응(cross-reaction)을 없애기 위해서는 Tween 20의 첨가가 필요하다. Tween 20의 농도범위는 0.001, 0.005, 0.01%로 test를 실시하였다.

[0092] ② SDS

[0093] 현재 이용되는 수침바이러스 유래 항원은 봉입체(inclusion body) 형태로 발견되고 있으므로 항원 단백질의 용해성을 유지하기 위해서는 어느 정도의 SDS양이 필요하다. 항원 정제 후 버퍼 교체(buffer change)를 실시하게 되면 용해성이 급격히 감소하고 그에 따라 항원성이 낮아지는 것으로 보여지고 있다.

[0094]

[0095] 항원 버퍼에 포함되는 계면활성제는 Tween 20이며, 0.001%, 0.01%, 0.05% 농도범위로 테스트한 결과 0.01% Tween 20이 적절하다는 것을 알 수 있었다. 그리고 항원 용해성을 유지하기 위해 적정농도의 SDS가 필요하다. 0.5%에서부터 0.01%까지 SDS 농도를 test한 결과 0.1% SDS가 현재로서는 적정 농도라는 것을 확인하였다.

[0096] **12-3. 골드-항체 중합체 농도 시험**

[0097] 분석시스템으로부터 발생된 특정신호 세기는 사용된 골드-항체 중합체의 양에 비례하여 증가된다. 그러나 과량으로 사용되면 비특정신호가 증가되어 위양성 결과가 초래된다. 본 실험에서는 중합체로 gold conjugated goat anti-human IgG(H+L) (BBI사, 40 nm)를 사용하였고, 골드-항체 중합체의 농도를 OD 2 ~ 6 사이에서 테스트하였다. 그 결과 IgM의 경우 OD 2, IgG의 경우 OD 4가 가장 적합하였다.

[0098] **12-4 스트립 제조**

[0099] 고안된 시스템은 플라스틱 백킹(backing)된 반응막인 NC 막을 기본골격으로 중간에 항원을 고정하고 중합체가 축적된 유리섬유막(결합패드(conjugate pad))을 하부에 붙이고, 과량의 수용액을 흡수하는 셀룰로오스 막을 양쪽 끝부분에 (샘플 패드 및 흡수 패드) 접촉되게 붙여서 상호간에 연결된 형태로 구성된다. 하단에 위치한 유리섬유막은 흡수력이 높아 단시간 내에 시료를 흡수할 수 있을 뿐만 아니라 용해된 중합체가 상부의 면역 스트립으로 이동되기 전에 정체시간을 연장시킴으로써 분석물질과 중합체간의 효율적인 반응을 유도할 수 있다. 중간의 면역 스트립상에는 분석물질 측정항원이 고정된 반응선(test line 또는 capture line)과 중합체를 감지할 수 있는 특이항체가 고정된 대조선(control line)을 공간적으로 분리하여 고정화시켰으며, 면역 스트립 상단에 위치한 흡수패드인 셀룰로오스 막은 과량의 시료가 신속히 흡수될 수 있도록 하였다(도 8).

[0100] 샘플패드에 환자혈청을 떨어뜨리고 관찰하면 양성(병원균에 감염)일 경우, 반응선(test line)에 나타나는 붉은색을 육안으로 관찰할 수 있다. 음성일 경우 대조선(control line)에서만 붉은색이 나타난다.

[0101] 12-5. IgM 및 IgG의 동시검출 신속진단키트 제조

[0102] 12-4와같이 제조한 IgM 및 IgG 각각에 대한 스트립을 너비 4mm 높이 60mm가 되도록 절단한 뒤, 한 플라스틱 디바이스에 넣어 동시에 진단할 수 있도록 제작하였다(도 9). 사용방법은 아래쪽의 작은 웰에 환자 혈장이나 혈청을 적당한 희석액으로 희석하여 300ul를 떨어뜨린 후 5분을 기다린 후 반응선(T로 표기된 위치), 대조선(C로 표기된 위치)에 붉은색의 발색을 관찰한다. 두 선 모두가 발색되면 양성이며, 대조선만 발색되면 음성이고, 아무런 발색도 나타나지 않으면 발색시스템에 이상이 있으므로 새로운 키트로 재시험을 하도록 고안하였다.

[0103] 실시예 13: 신속진단키트(RDK)의 민감도와 특이도

[0104] 본 실험에서 신증후출혈열 진단키트의 진단 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)를 알아보기 위하여 신증후출혈열 환자 혈청과 다른 급성열성질환(발진열, 랩토스피라증, 쯤쯤가무시병) 환자 혈청을 검체로 하여 검사를 하였다.

[0105] 13-1. IFA와 RDK의 민감도와 특이도 비교

[0106] 고려대학교 의과대학 미생물학교실에 의뢰하여 IFA결과 IgG 1:80 이상으로 신증후출혈열 환자로 진단된 31검체와 정상인 10검체에 대해, 전체단백(CNP)으로 제작한 진단키트(RDK)의 민감도와 특이도를 검사하였다.

**표 4**

[0107] Comparison of Hantaviral Human Antibody by IFA and RDK

IFA		RDK		
IgG(H+L)		IgG	IgM	IgG or IgM
HFRS(n=31)	31	27	21	29
Non-HFRS (n=10)	0	0	0	0

[0108] \* Serum dilution (1:80)

[0109] \* Sensitivity of RDK :  $29/31 \times 100 = 94\%$

[0110] 표 4에서 보는 바와 같이 titer 기준을 1:80으로 IFA를 한 것을 표준으로, RDK의 성능을 조사한 결과, IgM 및 IgG 각각에 대한 결과에서 민감도가 각 68% 및 87%를 나타내었고, IgM과 IgG의 검사결과를 종합하면 민감도는 94%였고, 특이도는 100%로 나타났다. IFA는 신증후출혈열 환자에서 항-한타바이러스 IgM을 발견하는데에는 제한이 있다. 그러나, RDK는 표 4 및 도 10에서 보는바와 같이 IFA IgG (1:80)을 기준으로 HFRS 환자로 진단된 혈청중에서 항-한타바이러스 IgM 검출률이 68%로 초기진단에 사용할 수 있음을 시사한다.

**표 5**

[0111] Comparison of IFA and RDK for Diagnosis of HFRS among Acute Febrile Illnesses (AFI)

	IFA			RDK (1:100) <sup>a</sup>		
	IgG(H+L) (1:80) <sup>a</sup>	IgM (1:20) <sup>a</sup>	IgG or IgM	IgG	IgM	IgG or IgM
HFRS (n=56)	56	21	56	48	42	55
Other AFI (n=150)	0	0	0	0	0	0

FUO (n=15)	0	0	0	1	0	1
Healthy control (n=10)	0	0	0	0	0	0

[0112] a : dilution ratio of sera

[0113] Sensitivity : 55/56 X 100 = 98%

[0114] Specificity among other AFI & FUO (fever of unknown origin): 164/165 X 100 = 99%

[0115] 다른 실험인 표 5에서 보는 바와 같이 IFA를 기준으로 RDK의 민감도는 98%, 특이도는 99%를 나타내고 있다. 그리고 열이 나는 증세가 있으나 IFA로는 원인은 파악할 수 없는 (FUO : fever of unknown origin) 15명 환자중에서 RDK에서는 1명이 양성 결과를 나타내고 있었다. 이 환자는 예전에 신증후출혈열에 감염되었던 경험이 있거나 열병의 원인이 HFRS일 수 있어, IFA에서는 진단할 수 없었던 것을 RDK에서는 진단할 수 있는 경우도 있다고 판단된다. 이 환자를 양성으로 본다면 RDK의 민감도는 100%로 볼 수 있을 것이다. 또한 IFA에서의 IgM은 38% 정도 검출되지만, RDK의 경우 75%에서 검출되어 2배의 민감도를 나타내고 있다. 이것은 RDK가 기존의 IFA에 비해 월등한 조기 진단의 능력이 있다는 것을 나타낸다(표 5, 도 11).

**도면의 간단한 설명**

[0116] 도 1은 수첨바이러스의 S 분절에 있어서 뉴클레오캡시드 단백질, 전체 단백질(Complete NP; CNP) 및 파편단백(Truncated NP; TNP)의 유전자 구조를 나타낸 그림이다.

[0117] 도 2는 PCR 반응 후의 단편단백(TNP)의 DNA 밴드(약 370bp) 및 전체단백(CNP)의 DNA 밴드(약 1300bp)를 나타낸 그림이다.

[0118] 도 3은 단편단백(TNP) DNA 및 전체단백(CNP) DNA를 pGem-T-Easy PCR 클로닝 벡터에 클로닝한 것을 나타낸 그림이다. pGT-SooV2-TNP는 단편단백(TNP)을 삽입한 플라스미드를 말하며, pGT-SooV2-CNP는 전체단백(CNP)을 삽입한 플라스미드를 의미한다.

[0119] 도 4는 N-말단에 His-Taq를 가지는 바칼로바이러스 플라스미드 벡터에 pGT-SooV2-TNP 및 pGT-SooV2-CNP의 PCR 산물을 클로닝한 것을 나타낸 pBac-SooV2-TNP 및 pBac-SooV2-CNP의 그림이다.

[0120] 도 5는 pBac-SooV2-TNP 및 pBac-SooV2-CNP를 바칼로바이러스 발현 벡터 시스템을 이용하여 Bac-SooV2-TNP와 Bac-SooV2-CNP로 제작한 것을 나타낸 그림이다.

[0121] 도 6은 단편단백(TNP)의 분리 검출을 위해 환자 및 정상인 혈청을 이용한 웨스턴 블롯 실시 결과를 나타낸 그림이다. 아래쪽 화살표의 밴드는 단편단백의 부분적인 분해에 의한 것으로 보인다. 왼쪽 사진은 1차 항체로 신증후출혈열 환자혈청을, 오른쪽 사진은 1차 항체로 정상인의 혈청을 사용한 결과이다. (1 lane: 야생형 바칼로바이러스를 감염시킨 세포의 용액분획, 2 lane: 제조합 바칼로바이러스를 감염시킨 세포의 용해분획, 3 lane: 세포의 비용해분획을 요소가 포함된 버퍼로 처리하고 원심분리한 후 상층액, 4 lane: 3을 정제한 분획)

[0122] 도 7은 단편단백(TNP) 및 전체단백(CNP)의 정제된 분획에 대한 웨스턴 블롯을 실시한 결과를 나타낸 그림이다. (1 lane: 바이러스를 감염시키지 않은 세포, 2 lane: 바칼로바이러스를 감염시킨 세포, 3 lane: 전체단백(CNP)을 클로닝한 제조합 바칼로바이러스를 감염시킨 세포, 4 lane: 단편단백(TNP)을 클로닝한 제조합 바칼로바이러스를 감염시킨 세포, 5 lane: 전체단백(CNP)을 클로닝한 제조합 바칼로바이러스를 감염시킨 세포, 6 lane: 단편단백(TNP)을 클로닝한 제조합 바칼로바이러스를 감염시킨 세포)

[0123] 도 8은 면역크로마토그래피 기술을 도입하여 제작한 본 발명에 따른 진단 키트 내의 테스트 스트립의 구조를 나타낸 그림이다.

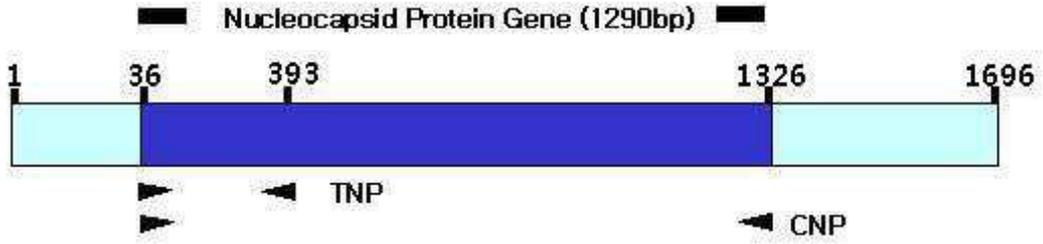
[0124] 도 9는 본 발명의 진단 키트에 있어서 플라스틱 디바이스로 캡핑한 최종 제품의 구조를 도식한 것이다.

[0125] 도 10은 간접면역형광항체법(IFA)에 의해 신증후출혈열에 대한 IgG 항체가 검출된 환자(31검체)를 대상으로 본 발명에 따른 진단 키트(RDK)에 의한 항체 검사 결과이다. IgM 및 IgG 각각에 대한 검사에서 민감도는 각 68% 및 87%를 나타내었고, IgM과 IgG의 검사 결과를 종합한 RDK의 민감도는 94%를 나타내었다.

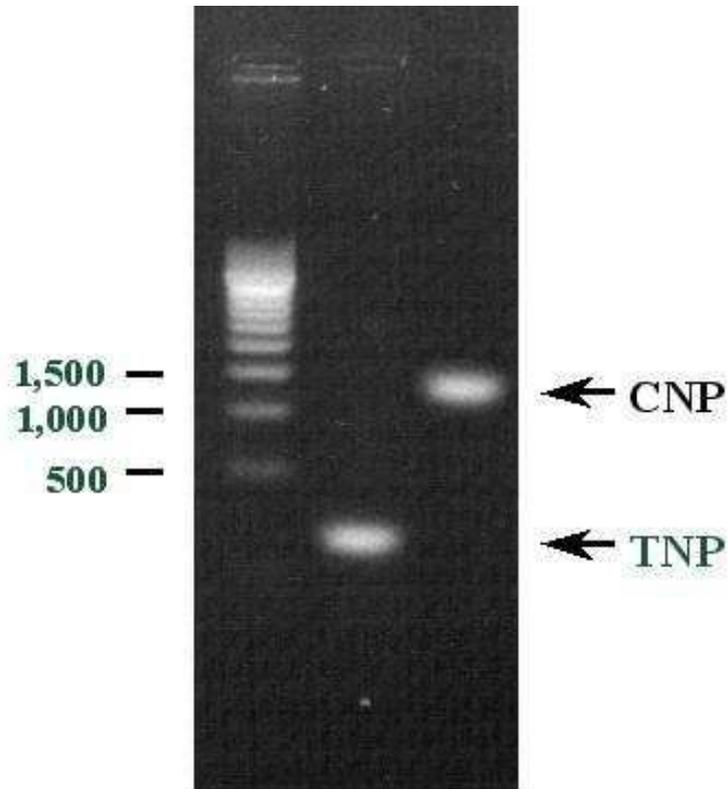
[0126] 도 11은 본 발명에 따른 진단 키트(RDK)의 민감도 및 특이도를 나타낸다. 또한 간접면역형광항체법(IFA)과 본 진단키트(RDK)의 IgM 검출 비율을 비교한 결과를 보여준다.

도면

도면1



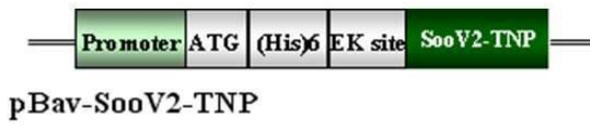
도면2



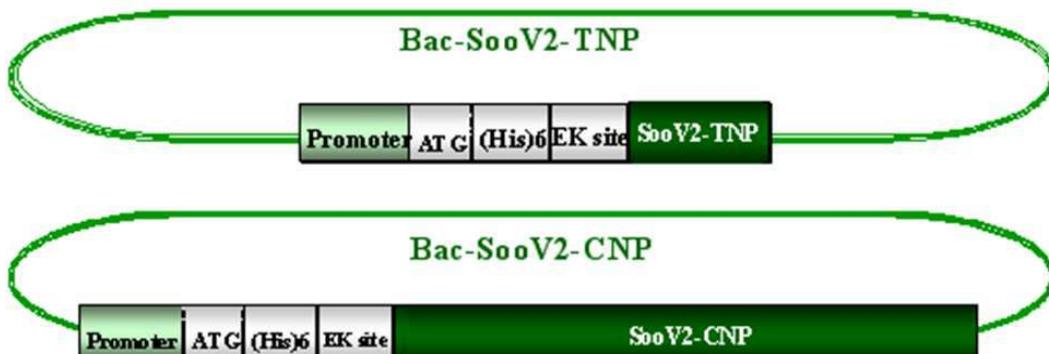
도면3



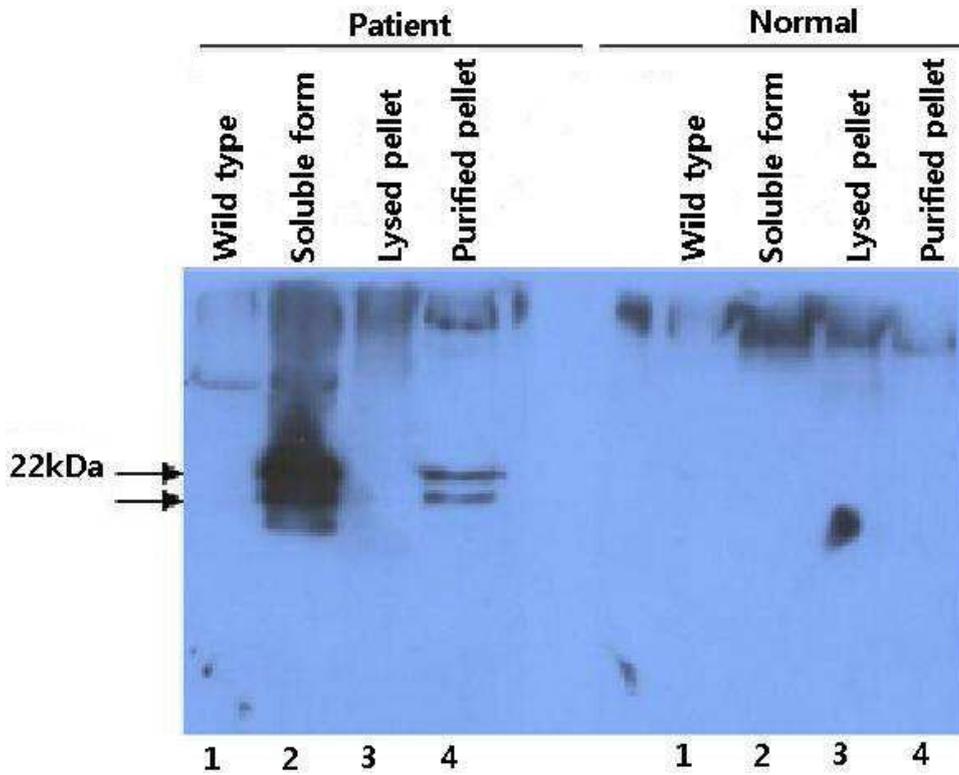
도면4



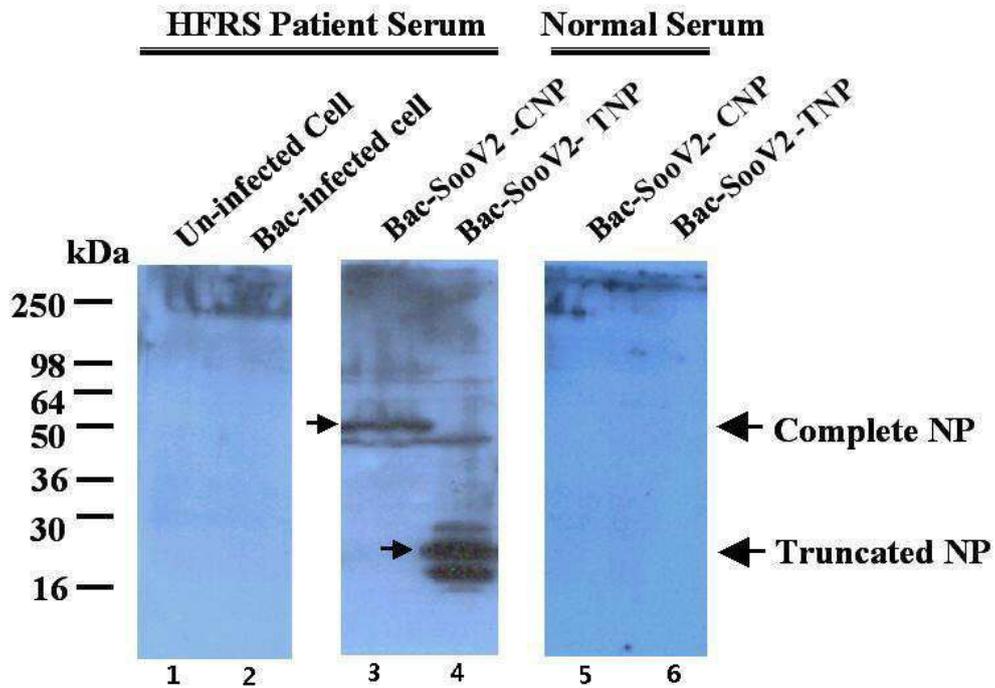
도면5



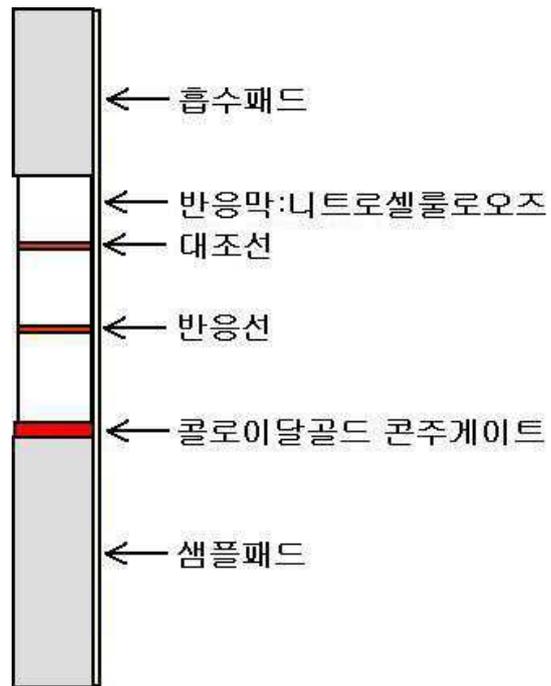
도면6



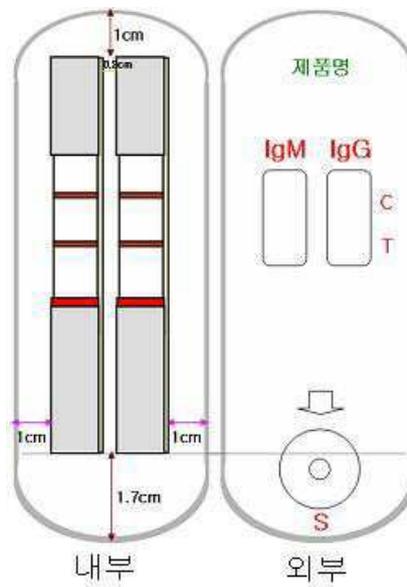
도면7



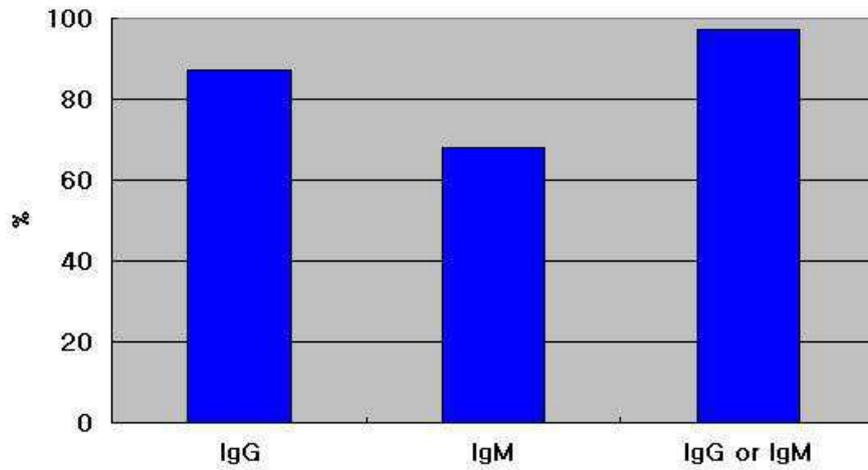
도면8



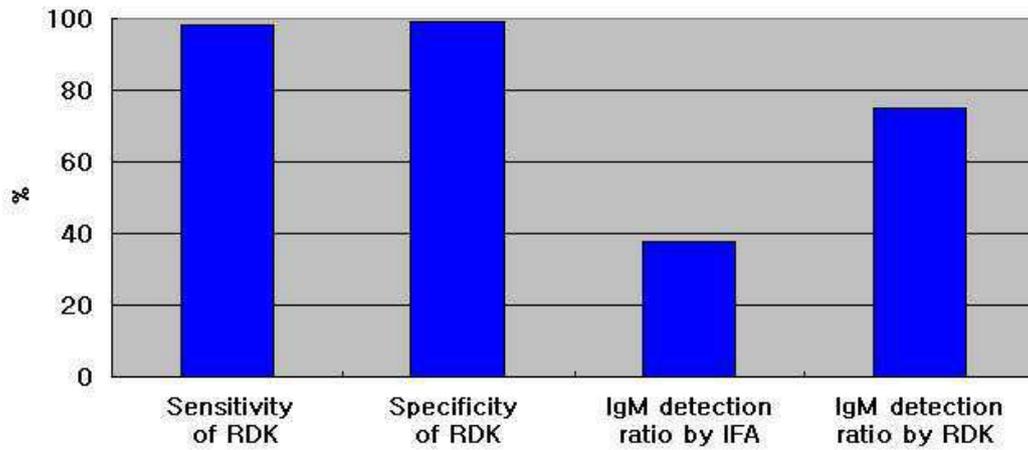
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> Immunemed Co.
- <120> Rapid diagnostic kit of hemorrhagic fever with renal syndrome detecting specific IgM and IgG using nucleocapsid protein derived Soochong virus
  
- <130> PA9608-494/KR
  
- <160> 7
  
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1  
 <211> 1696  
 <212> DNA  
 <213> S(small) segment of Soochong virus

<400> 1  
 tagtagtaga ctccctaaag agctacgata caaacaatgg caactatgga ggaattgcaa 60  
 aaggagatca atgcccataga gggtaactt gtgatagcaa ggcaaaaagt aagggatgca 120  
 gaaagccaat atgagaagga tccagatgag ttgaaccaa gagcattaac agacagagaa 180  
 ggggttcag catccattca ggcaaaaatt gatgaattaa agaggcagtt ggcagataga 240  
 atagcaactg gaaaaaacct gggaaaggag caagaccaa cagggttga acccgggac 300  
 catttaaag agagatcaat gctcagctat gggaatgtac tggattttaa ccatctagac 360  
 atgatgagc caacaggta gactgcagac tggctgagca ttgtgttta tcttacatcc 420  
 tttgtggttc cgatactcct gaaagccctt cagatgctga caacaagggg aagacagaca 480  
 actaaggaca ataaaggac aagaatccga ttcaaagatg acagctcttt tgaagatgtg 540  
 aatggaattc ggaagccgaa acatctctat gtgtctttac ctaatgcaca gtctagatg 600  
 aaggcagaag agataacacc tggaaagtac aggacagcaa tctgtggatt ataccctgct 660  
 cagattaaag ccagacagat ggtaagcca gtcagatg taattggatt ccttgccttg 720  
 gctaaagact ggggtgatag gattgagcag tggctaagtg aaccctgtaa gtcctccca 780  
 gacacagcag cagtaagcct ccatggtggt cctgcaacta atagagatta tctccggcaa 840  
 aggcaggcag ctttaggaaa catggagact aaggagtcaa aagcaatccg ccaacatgca 900  
 gaagcagcag gctgtagcat gatagaagat atcgagtcac catcatccat ctgggtgttt 960

gctggggccc cagaccgatg cccaccaaca tgtttattca ttgcagggat tgcagagtta 1020

ggtgcctttt tttccatctt acaagataig cggaaacta taaaggcatc taagacagtt 1080

ggcacatcag aggaaaagtt gagaaagaag tcatcatctt accagtctta cctcaggaga 1140

acacaatcaa tgggaataca actggaccag agaattattg ttcctcttat ggttgctctg 1200

gggaaggaag cagtggataa tttccatctt ggagatgacg tggatcctga attgaggaca 1260

ctagcacaga gtttgattga tctaaaagtg aaggaaattt caaccaaga acctttaaaa 1320

ctataatcac tgaatgtata aatcctttta tggattatc atatactact gaatcattat 1380

caatcatatt tgcactatta ttatcagggg aatcagtata tcagggcatg ggaacattta 1440

tgggtgggaa tcattactca ggggtgggtc agttaatccg ttgtgggtgg gtttagctcc 1500

aggctacctt aagtagcctt tttttgtata tatggatgta gatttcattt gatccttaac 1560

taatcttggt ttctttccct ttctttctgc tttctctgct tactaacaac aacattctac 1620

ctcaacacaa aactacctca acttaactac ctcatctgat tgcctcttga ttgtcttttt 1680

agggagcata ctacta 1696

<210> 2  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> complete nucleocapsid protein in S segment of Soochong virus

<400> 2  
 Met Ala Thr Met Glu Glu Leu Gln Lys Glu Ile Asn Ala His Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Leu Val Ile Ala Arg Gln Lys Val Arg Asp Ala Glu Arg Gln Tyr  
 20 25 30

Glu Lys Asp Pro Asp Glu Leu Asn Gln Arg Ala Leu Thr Asp Arg Glu  
 35 40 45

Gly Val Ala Ala Ser Ile Gln Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Arg Gln  
 50 55 60

Leu Ala Asp Arg Ile Ala Thr Gly Lys Asn Leu Gly Lys Glu Gln Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Val Glu Pro Gly Asp His Leu Lys Glu Arg Ser Met Leu  
 85 90 95

Ser Tyr Gly Asn Val Leu Asp Leu Asn His Leu Asp Ile Asp Glu Pro  
 100 105 110

Thr Gly Gln Thr Ala Asp Trp Leu Ser Ile Val Val Tyr Leu Thr Ser  
 115 120 125

Phe Val Val Pro Ile Leu Leu Lys Ala Leu His Met Leu Thr Thr Arg  
 130 135 140

Gly Arg Gln Thr Thr Lys Asp Asn Lys Gly Thr Arg Ile Arg Phe Lys  
 145 150 155 160

Asp Asp Ser Ser Phe Glu Asp Val Asn Gly Ile Arg Lys Pro Lys His  
 165 170 175

Leu Tyr Val Ser Leu Pro Asn Ala Gln Ser Ser Met Lys Ala Glu Glu  
 180 185 190

Ile Thr Pro Gly Arg Tyr Arg Thr Ala Ile Cys Gly Leu Tyr Pro Ala  
 195 200 205

Gln Ile Lys Ala Arg Gln Met Val Ser Pro Val Met Ser Val Ile Gly  
 210 215 220

Phe Leu Ala Leu Ala Lys Asp Trp Gly Asp Arg Ile Glu Gln Trp Leu  
 225 230 235 240

Ser Glu Pro Cys Lys Leu Leu Pro Asp Thr Ala Ala Val Ser Leu His  
 245 250 255

Gly Gly Pro Ala Thr Asn Arg Asp Tyr Leu Arg Gln Arg Gln Ala Ala  
 260 265 270

Leu Gly Asn Met Glu Thr Lys Glu Ser Lys Ala Ile Arg Gln His Ala



Gly Val Ala Ala Ser Ile Gln Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Arg Gln  
 50 55 60

Leu Ala Asp Arg Ile Ala Thr Gly Lys Asn Leu Gly Lys Glu Gln Asp  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Val Glu Pro Gly Asp His Leu Lys Glu Arg Ser Met Leu  
 85 90 95

Ser Tyr Gly Asn Val Leu Asp Leu Asn His Leu Asp Ile Asp Glu Pro  
 100 105 110

Thr Gly Gln Thr Ala Asp Trp  
 115

<210> 4  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> forward primer for complete nucleocapsid protein

<400> 4  
 agatctaag gcaactatgg aggaattg 28

<210> 5  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> reverse primer for complete nucleocapsid protein

<400> 5  
 aagcctatag ttttaaaggt tcttggttg 30

<210> 6  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> forward primer for truncated nucleocapsid protein

<400> 6  
 agatctaag gcaactatgg aggaattg 28

<210> 7

<211> 28  
<212> DNA  
<213> reverse primer for truncated nucleocapsid protein

<400> 7  
aagcttacca gctgcagtc tgacctgt

28